



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 22 362.1
Anmeldetag: 08. Mai 2000
Anmelder/Inhaber: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT,
Leverkusen/DE
Bezeichnung: Verfahren zum Auffinden von Modulatoren von
Enzymen des Carotenoid-Biosyntheseweges
IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 08. März 2001
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Verfahren zum Auffinden von Modulatoren von Enzymen des Carotenoid-Biosyntheseweges

- 5 Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für die die Zeta Carotene Synthase aus Tabak kodieren, davon kodierte Polypeptide sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren der Aktivität der Zeta Carotene Synthase, der Phytoene Synthase und der Phytoene Desaturase.
- 10 Unerwünschtes Pflanzenwachstum kann durch die Verwendung von Herbiziden verhindert werden. Die Ansprüche an Herbizide sind dabei hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Kosten und Umweltverträglichkeit stetig angestiegen. Es existiert deshalb ein Bedarf an neuen Substanzen, die zu leistungsfähigen neuen Herbiziden entwickelt werden können. Im Allgemeinen ist es üblich, in Gewächshaustests nach solchen
- 15 neuen Leitstrukturen zu suchen. Solche Tests sind jedoch arbeitsintensiv und teuer. Die Anzahl der Substanzen, die im Gewächshaus getestet werden können, ist entsprechend begrenzt.
- 20 Vorteilhafte Angriffspunkte für Herbizide werden in pflanzenspezifischen Biosynthesewegen gesucht, die in tierischen Organismen nicht vorkommen. Ein Beispiel dafür ist der Carotenoid-Biosyntheseweg.
- 25 Die Carotinoide haben im Stoffwechsel der Pflanzen vielfältige Bedeutung. Sie sind im photosynthetischen Apparat mit dem *Light Harvesting Complex* assoziiert, der die optimale Weiterleitung der einstrahlenden Photonen an die photosynthetischen Reaktionszentren garantiert. Des weiteren sind sie an der Dissipation überschüssiger Lichtenergie und dem Abfangen von Sauerstoffradikalen beteiligt, und besitzen demnach eine Schutzfunktion. Neben der Bedeutung für die Photosynthese sind die Carotinoide Precursor für die Biosynthese der Xantophylle und den Wachstumsregulator Abscisinsäure. In den Blüten und Früchten fungieren die Carotinoide als
- 30

Farbpigmente, beispielsweise das Lycopin in der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) oder das β -Carotin in der Karotte (*Daucus carota*).

Die Biosynthese der Carotinoide findet in den Plastiden statt. Der Precursor für die
5 Synthese ist das Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat. Es wird vermutlich über den
sogenannten DXP- oder auch Rohmer-Pathway gebildet und nicht über den klassi-
schen Mevalonat-Weg (Lichtenthaler, 1997). Zwei Moleküle Geranylgeranylpyro-
phosphat (GGPP) werden durch die Phytoene Synthase (PSY) in einer Kopf-Kopf-
Kupplung zu einem Molekül Phytoen umgesetzt (Abbildung 1). Durch die Enzyme
10 Phytoene Desaturase (PDS) und Zeta Carotene Desaturase (ZDS) werden sukzessive
vier weitere Doppelbindungen eingeführt. Dabei katalysiert jedes Enzym die Dehy-
drierung an symmetrischen Positionen (Abbildung 1).

Das entstehende Lycopin wird dann in einem ersten Schritt entweder durch die
15 Lycopene ϵ -Cyclase (LCYe) zu δ -Carotin oder die Lycopene β -Cyclase (LCYb) zu
 γ -Carotin umgesetzt. In einem zweiten Schritt entstehen daraus α - respektive β -
Carotin. Diese zweite Zyklisierung wird jeweils durch die Lycopene β -Cyclase
durchgeführt. α - und β -Carotin bilden dann die Precursor für die Synthese der
Xanthophylle wie Lutein, Astaxanthin, Violaxanthin u.s.w..

20 Sämtliche an der Biosynthese der Carotinoide und Xanthophylle beteiligte Enzyme
sind nukleär kodiert. Von fast allen Proteinen sind die Gensequenzen aus mindestens
einer Pflanze bekannt. Das translatierte Präprotein wird über eine Erkennungs-
sequenz, das Transitpeptid, in den Chloroplasten importiert, prozessiert, oligomeri-
25 siert und gegebenenfalls transloziert. Dieser Prozess findet unter Beteiligung des
Chaperons Cpn60 und des Heat-Shock-Proteins Hsp70 statt (Bonk, 1997)..

Die Phytoene Synthase ist ein Protein von ~45 kDa. Die PSY benötigt als Cofaktoren
Manganionen und ATP (Dogbo, 1988). Des weiteren ist für die Aktivität des pflanz-
30 lichen Enzyms die Assoziation an Galactolipide erforderlich. Bei der Überexpression
der PSY aus *Erwinia uredovora* wurde eine Sensitivität gegenüber Phosphat und eine

Inhibierbarkeit durch Squalestatin mit einem pI-Wert von 15 μ M gemessen (Neudert, 1998). Das korreliert mit der Homologie auf Aminosäureebene von ~34 % der bekannten PSY-Gene zu Squalensynthasen und weist auf eine enge Verwandtschaft dieser beiden Enzyme hin. Die Synthese von Squalen läuft über die analoge Kopf-Kopf-Kupplung von zwei Molekülen Farnesylpyrophosphat ab, die mechanistisch der Phytoensynthese entspricht. Für die Phytoene Synthase aus *Capsicum annuum* konnte eine lichtabhängige Induktion der Expression nachgewiesen werden (Lintig, 1997). Die Überexpression der fruchtspezifischen PSY1 in Tomatenpflanzen führte phänotypisch zu Zwergenwuchs. Dies wurde auf die Umleitung von Geranylgeranylpyrophosphat aus der Giberellin- in die Carotinoidbiosynthese zurückgeführt (Fray, 1995). DNA kodierend für die PSY, z. B. aus der Melone und aus *Nicotiana*-Spezies wurde bereits beschrieben (WO 96/02650, US 5,705,624). Bislang ist jedoch über die Bedeutung der Phytoene Synthase für die Vitalität einer Pflanze jedoch nichts bekannt geworden. Ob das Ausschalten des Gens kodierend für die PSY für eine Pflanze letal ist, das Enzym also als Zielmoleküle für herbizid wirksame Substanzen geeignet ist, wurde bislang nicht bekannt.

Die Phytoene Desaturase ist ein Protein von ~64 kDa. Die PDS wird durch Flavinylierung aktiviert und verwendet Plastoquinon als Elektronenakzeptor (Norris, 1995). Über die Regulation der Phytoene Desaturase liegen widersprüchliche Angaben vor. So wird einerseits von einer Beeinflussung der PDS-Genexpression durch den Chlorophyll- und Pigmentgehalt berichtet (Corona, 1996), andererseits die Abhängigkeit der PDS-Expression vom Pigmentgehalt negiert (Woetzel, 1998). Nach Inhibition der PDS mit den bekannten Inhibitoren Norflurazon bzw. Fluridon konnte *in vitro* ein Verlust der Aktivität des Photosystems II nachgewiesen werden. Dieser Aktivitätsverlust wurde auf die Notwendigkeit des Vorhandenseins von β -Carotene für den Einbau des D1-Proteins in ein funktionelles Photosystems II zurückgeführt (Trebst, 1997). Ob das Ausschalten der Phytoene Desaturase für die Pflanze jedoch letal ist, das Enzym also als Zielmolekül für herbizide Wirkstoffe geeignet ist, wurde bislang jedoch nicht untersucht. Die Sequenz der Phytoene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* ist im Dokument US 5,539,093 beschrieben. Diese Sequenz soll ausdrück-

lich Teil der vorliegenden Anmeldung sein. DNA-Sequenzen kodierend für die PDS finden sich unter anderem in der WO 99/55888.

5 Die Zeta Carotene Desaturase hat eine Größe von ~65 kDa und ist das am wenigsten charakterisierte Enzym der Carotinoid-Biosynthese. Die Sequenzen der bekannten pflanzlichen ZDS, z. B. aus Reis, Mais, Weizen, Soja oder *Capsicum annuum* (WO 99/55888), weisen Homologien um 34 % zu den bekannten PDS-Sequenzen auf. Über die Regulation der ZDS liegen bis dato keine Angaben vor.

10 Die Lycopene β -Cyclase ist ein Protein mit einer Größe von ~55 kDa. In den Plastiden kompetiert sie mit der Lycopene ϵ -Cyclase um das gemeinsame Substrat Lycopin. Im Gegensatz zu den β -Cyclasen, von denen die Gene aus verschiedenen Pflanzen bekannt sind, sind bei der ϵ -Cyclase nur die pflanzlichen Gene aus *Arabidopsis thaliana* und Tomate bekannt. Der Vergleich der Sequenzen der zwei
15 Cyclase-Typen zeigt eine Homologie auf Aminosäureebene von ~36%. Die Zyklisierung des Lycopins durch die beiden Cyclasen stellt einen Verzweigungspunkt der Carotinoidbiosynthese und damit einen sinnvollen Regulationspunkt dar. Unter Starklicht steigt das Verhältnis von β - zu ϵ -Cyclase und es werden mehr der protektiven Xanthophylle Zeaxanthin, Violaxanthin und Antheraxanthin gebildet. Bei
20 Schwachlicht sinkt das Verhältnis von β - zu ϵ -Cyclase und es wird mehr an der Lichternte beteiligtes Lutein gebildet (Cunningham, 1996).

Die Biosynthese der Carotinoide wie auch der Xanthophylle stellt einen hochgradig regulierten Prozess dar. In den Chloroplasten der photosynthetischen Gewebe findet
25 eine Regulation der Biosynthese in Abhängigkeit von der Lichtintensität statt. Demgegenüber steht in den Chromoplasten der Blüten und Früchte eine Regulation in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. In den Früchten der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) wird die Rotfärbung im Verlauf der Reifung durch die Akkumulation von Lycopin erreicht. Diese Akkumulation geht einher mit einer Erhöhung der
30 Transkriptmengen der PSY und der PDS. Gleichzeitig verschwinden die Transkripte für die Lycopin-Cyclasen (Pecker, 1996).

Über die genauen Mechanismen der Regulation der Carotinoidbiosynthese ist nur wenig bekannt.

- 5 Die vorliegende Anmeldung beschreibt die Klonierung von Genen der Carotinoid-Biosynthese. Dabei wurden unter anderem zwei Phytoene Synthase-Gene gefunden. Eine Analogie zur entwicklungsabhängigen Regulation wie bei der Tomate konnte nicht gezeigt werden. Es besteht die Möglichkeit einer Regulation in Abhängigkeit von der Lichtintensität. In diesem Fall könnte ein Gen die *house keeping* –Aktivität
- 10 kodieren, das andere hingegen in Abhängigkeit von der Lichtintensität reguliert sein.

Die vorliegende Anmeldung beschreibt ebenfalls die Klonierung des Gens kodierend für die Zeta-Carotene Desaturase.

- 15 Die Anmeldung beschreibt ebenfalls die Klonierung des Gens kodierend für die Phytoene Desaturase aus *Nicotiana tabacum*.

- Die vorliegende Anmeldung beschreibt ebenfalls, dass die bekannten Enzyme des Carotinoid-Biosyntheseweges, die Phytoene Synthase, die Phytoene Desaturase
- 20 sowie die Zeta Carotene Desaturase, die durch die Katalyse aufeinander folgender Schritte bei der Biosynthese von Carotenoiden miteinander in Zusammenhang stehen, von essentieller Bedeutung für Pflanzen sind. Die vorliegende Anmeldung beschreibt ebenfalls, dass die Enzyme Phytoene Synthase, Phytoene Desaturase sowie Zeta Carotene Desaturase als Zielmoleküle (Targets) für herbizide Wirkstoffe
- 25 geeignet sind und deshalb in Verfahren zum Auffinden von herbiziden Wirkstoffen verwendet werden können.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demnach die Verwendung der Enzyme der Carotenoid-Biosynthese, der Phytoene Synthase, der Phytoene Desaturase und
- 30 der Zeta Carotene Desaturase, in Verfahren zum Auffinden von herbizid wirksamen Substanzen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer Phytoene Synthase, welche die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 umfasst, kodieren.
5 Insbesondere kodieren die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren für die Phytoene Synthase aus Tabak, wobei die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aus *Nicotiana tabacum* SR1 besonders bevorzugt sind.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für die Phytoene Synthase kodieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer Zeta-Carotene Desaturase, welche die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 6 umfasst, kodieren. Ins-
15 besondere kodieren die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren für die Zeta-Carotene Desaturase aus Tabak, wobei die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aus *Nicotiana tabacum* SR1 besonders bevorzugt sind.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für die Zeta-Carotene Desaturase kodieren.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA,
25 die gegebenenfalls auch Introns enthalten können, und cDNAs.

Die Fragmente können dabei ebenfalls einzelsträngig oder doppelsträngig sein, wobei einzelsträngige Fragmente komplementär zum kodogenen oder zum kodierenden Strang der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sein können. Solche einzelsträngigen
30 Fragmente können dann jeweils an den kodogenen oder an den kodierenden Strang der erfindungsgemäßen Nukleinsäure hybridisieren.

Der Ausdruck "Fragment", wie er hierin verwendet wird, umfasst dabei einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäuren einer Länge von 10 bis 1 000 Basenpaaren (bp), bevorzugt einer Länge von 12 bis 500 bp, besonders bevorzugt einer Länge von 15 bis 200 bp und ganz besonders bevorzugt einer Länge von 20 bis 100 Basenpaaren.

Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um DNA, die der genomischen DNA von Tabakpflanzen, die Introns enthalten kann, oder Fragmenten davon entspricht.

Besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Sequenz ausgewählt aus

- a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5
- b) Sequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 umfasst,
- c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen,
- d) Sequenzen, welche an die unter a), b) oder c) definierten Sequenzen hybridisieren,
- e) Sequenzen, welche zu den unter a), b) oder c) definierten Sequenzen komplementär sind, und
- f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz codieren wie die unter a) bis c) definierten Sequenzen.

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 dar.

- 5 Eine weitere ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3 dar.

Eine weitere ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 5 dar.

10

- Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Pflanzen als Tabakpflanzen isoliert werden, welche für die Phytoene Synthase oder die Zeta Carotene Desaturase kodieren, welche dieselben oder ähnliche Eigenschaften wie die Enzyme mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4, bzw. SEQ ID NO: 5 aufweisen.
- 15

- 20 Hybridisierungsbedingungen werden nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

Die Schmelztemperatur $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log\{c(\text{Na}^+)\} + 0,41(\%G + C) - 500/n$ (Lottspeich und Zorbas, 1998).

25

- Dabei ist c die Konzentration und n die Länge des hybridisierenden Sequenzabschnitts in Basenpaaren. Für eine Sequenz >100 bp entfällt der Ausdruck $500/n$. Mit höchster Stringenz wird bei einer Temperatur $5-15^{\circ}\text{C}$ unterhalb T_m und einer Ionenstärke von 15 mM Na^+ (entspricht $0.1 \times \text{SSC}$) gewaschen. Wird eine RNA-Probe zur Hybridisierung verwendet, so ist der Schmelzpunkt um 10 bis 15°C höher.
- 30

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:

Hybridisierungslösung: 6X SSC / 5X Denhardt's Lösung / 50 % Formamid;

Hybridisierungstemperatur: 36°C, bevorzugt 42°C;

1. Waschschrift: 2X SSC, 30 min bei Raumtemperatur;

- 5 2. Waschschrift: 1X SSC, 30 min bei 50°C; bevorzugt 0,5X SSC, 30 min bei 65°C;
besonders bevorzugt 0,2X SSC, 30 min bei 65°C.

Der Grad der Identität der Nukleinsäuren wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms NCBI BLASTN Version 2.0.4. (Altschul et al., 1997).

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die regulatorischen Regionen, welche natürlicherweise in Pflanzenzellen, insbesondere in Tabakpflanzen, die Transkription der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kontrollieren.

15

Der Ausdruck "regulatorische Regionen", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf nicht-translatierte Regionen des betreffenden Gens, wie Promotoren, Enhancer, Repressor- oder Aktivator-Bindungsstellen oder Terminationssequenzen, die mit zellulären Proteinen interagieren, wodurch die Transkription gesteuert wird.

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und einen heterologen Promotor umfassen.

25

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

30

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus für pflanzliche Zellen, der Promoter der Alkoholdehydrogenase für Hefezellen, die T3-, T7- oder SP6-Promotoren für prokaryotische Zellen oder zellfreie Systeme.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner Vektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, eine erfindungsgemäße regulatorische Region oder ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendeten Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

Bevorzugte Vektoren sind pBIN (Bevan, 1984) und seine Derivate für pflanzliche Zellen, pFL61 (Minet et al., 1992) für Hefezellen, pBLUESCRIPT-Vektoren für bakterielle Zellen, lamdaZAP (Fa. Stratagene) für Phagen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten.

Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise *E. coli*, als auch eukaryotische Zellen, wie Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Insekten, Pflanzen, Froschoozyten und Zelllinien von Säugern.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer Phytoene Synthase, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden. Insbesondere handelt es sich um Polypeptide, die erfindungsgemäße Phytoene Synthasen darstellen. Ganz besonders sind die Polypeptide Gegenstand dieser Erfindung, die einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 entsprechen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer Zeta Carotene Desaturase, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden. Insbesondere handelt es sich um Polypeptide, die erfindungsgemäße Zeta Carotene Desaturasen darstellen. Ganz besonders sind die Polypeptide Gegenstand dieser Erfindung, die einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6 entsprechen.

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise am Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide müssen nicht eine vollständige Phytoene Synthase bzw. Zeta Carotene Desaturase darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Phytoene Synthase bzw. Zeta Carotene Desaturase aufweisen. Solche Fragmente, die eine gleichartige biologische Aktivität wie eine Phytoene Synthase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 oder eine gleichartige biologische Aktivität wie eine Zeta Carotene Desaturase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6 ausüben, werden als erfindungsgemäß betrachtet.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu den entsprechenden Regionen von natürlich vorkommenden Phytoene Synthasen bzw. Zeta Carotene Desaturasen aus Tabak Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Enzyme ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

5 Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Phytoene Synthase aus Tabak mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4.

10 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Zeat Carotene Desaturase aus Tabak mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Antikörper, die spezifisch an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Diese Antikörper können beispielsweise dazu genutzt werden, um Expressionsklone, z.B. einer Genbank, zu identifizieren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren tragen.

Der Ausdruck "Antikörper", wie er hierin verwendet wird, erstreckt sich auch auf Teile vollständiger Antikörper, wie Fa-, F(ab')₂- oder Fv-Fragmente, welche noch die Fähigkeit besitzen, an die Epitope der erfindungsgemäßen Polypeptide zu binden.

Weiterhin sind auch Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch kurze Stücke der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können auch verwendet werden, um ausgehend von Pflanzen-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA-Fragmente ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuren können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Polypeptide. Zur Herstellung der Polypeptide, die von den erfin-

5 dungsgemäßen Nukleinsäuren codiert werden, können Wirtszellen, die erfindungsgemäße Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden. Die Polypeptide können auch in *in-vitro*-Systemen hergestellt werden.

10 Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker
15 kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

20 Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

25 Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäßen Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-
30 fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden und deren Eigenschaften verändern. Solche Verbindungen können als Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide wirken, entweder als Agonisten oder als Antagonisten.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, die an die Phytoene Desaturase binden und deren Eigenschaften verändern, wobei diese Verbindungen als Agonisten oder Antagonisten wirken können

15 Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die enzymatische Aktivität des Enzyms Phytoene Synthase, des Enzyms Phytoene Desaturase oder des Enzyms Zeta Carotene Desaturase beschleunigt oder verstärkt.

20 Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die enzymatische Aktivität des Enzyms Phytoene Synthase, des Enzyms Phytoene Desaturase oder des Enzyms Zeta Carotene Desaturase verlangsamt oder inhibiert.

25 Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beein-
30

flusst. Modulatoren können natürliche Substrate und Liganden darstellen oder strukturelle oder funktionelle Mimetika davon.

5 Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

Die Bindung der Modulatoren an die Enzyme Phytoene Synthase, Phytoene Desaturase und Zeta-Carotene Desaturase kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben der damit behandelten Pflanzen führt.

10

Die vorliegende Erfindung umfasst damit auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase sowie der Phytoene Desaturase in Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, die die Aktivität der Enzyme beeinflussen.

15

Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, welche die Expression der Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase sowie der Phytoene Desturase verändern. Auch solche "Expressionsmodulatoren" können neue wuchsregulierende oder herbizide Wirkstoffe darstellen. Expressionsmodulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die regulatorischen Regionen der für die Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder die Phytoene Desturase kodierenden Nukleinsäuren binden. Weiterhin können Expressionsmodulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an regulatorische Regionen der für die Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase sowie der Phytoene Desaturase kodierenden Nukleinsäuren bindet, und dadurch deren Expression beeinflusst. Expressionsmodulatoren können auch Antisense-Moleküle sein.

20

25

30

Daher erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von Modulatoren der Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase und der Phytoene

Desaturase oder von Expressionsmodulatoren als Pflanzenwuchsregulatoren oder Herbizide.

5 Die erfindungsgemäßen Verfahren schließen Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening; HTS) ein. Dafür können sowohl Wirtszellen als auch zellfreie Präparationen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder die Phytoene Desaturase oder dafür kodierende Nukleinsäuren enthalten.

10 Um Modulatoren aufzufinden, kann ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der *in vitro*-Transkription) oder ein zellulärer Bestandteil, der die Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder die Phytoene Desaturase enthält, zusammen mit einem markierten Substrat oder Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Agonist oder Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls die Aktivität der Phytoene
15 Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder der Phytoene Desaturase zu erhöhen oder zu hemmen, wird erkennbar an einer erhöhten oder verringerten Bindung des markierten Liganden oder an einer erhöhten oder verringerten Umsetzung des markierten Substrates. Moleküle, die gut binden und zu einer erhöhten Aktivität der Phytoene
20 Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder der Phytoene Desaturase führen, sind Agonisten. Moleküle, die gut binden, aber nicht die biologische Aktivität der Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder der Phytoene Desaturase auslösen, sind wahrscheinlich gute Antagonisten. Die Detektion der biologischen Aktivität der
25 Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder der Phytoene Desaturase kann durch ein sogenanntes Reportersystem verbessert werden. Reportersysteme in dieser Hinsicht umfassen, sind aber nicht beschränkt auf colorimetrisch markierte Substrate, die in ein Produkt umgewandelt werden oder ein Reportergen, das auf Veränderungen der Aktivität oder der Expression der Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder der Phytoene Desaturase anspricht oder andere bekannte Bindungstests.

30

Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder der Phytoene Desaturase aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem man unter dafür geeigneten Bedingungen die Phytoene Synthase, Zeta Carotene Desaturase oder die Phytoene Desaturase und
5 einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Die erfindungsgemäßen Polypeptide oder die Phytoene Desaturase selbst können markiert werden, z.B. radioaktiv oder colorimetrisch, so dass man die Anzahl der Polypeptide, die an
10 einen Liganden gebunden sind oder die eine Umsetzung mitgemacht haben, exakt bestimmen kann. Auf diese Weise lässt sich die Effektivität eines Agonisten oder Antagonisten ermessen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäßen
15 Nukleinsäure, eines erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts oder eines erfindungsgemäßen Vektors zum Herstellen von transgenen Pflanzen, sowie die entsprechenden transgenen Pflanzen als solche bzw. deren Teile oder Vermehrungsmaterial.

Transgene Pflanzen, Pflanzenteile, Protoplasten, Pflanzengewebe oder Pflanzenver-
20 mehrungsmaterialien, in denen nach Einbringen einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, eines erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts oder eines erfindungsgemäßen Vektors die intrazelluläre Konzentration der rezeptorähnlichen Proteinkinasen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypformen erhöht oder vermindert ist, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25 Der Ausdruck "Pflanzenteile", wie er hierin verwendet wird, bedeutet alle oberirdischen und unterirdischen Teile und Organe der Pflanzen, wie Spross, Blatt, Blüte und Wurzel, sowie daraus hergestellte Protoplasten und Gewebekulturen.

Der Ausdruck "Vermehrungsmaterial", wie er hierin verwendet wird, bedeutet vegetatives und generatives Vermehrungsmaterial, wie Stecklinge, Knollen, Rhizome, Ableger und Samen.

5 Gegenstand der Erfindung sind auch Pflanzen, in denen Veränderungen an der die Phytoene Synthase kodierenden Sequenz vorgenommen und selektioniert werden, die zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Phytoene Synthase führen, oder in denen durch Mutagenese eine Erhöhung oder Verminderung der endogenen Phytoene Synthaseaktivität erreicht wird.

10

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Pflanzen, in denen Veränderungen an der die Zeta-Carotene Desaturase kodierenden Sequenz vorgenommen und die Pflanzen dann selektioniert werden, die zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zeta-Carotene Desaturase führen oder in denen durch Mutagenese eine Erhöhung oder
15 Verminderung der endogenen Zeta-Carotene Desaturaseaktivität erreicht wird.

Beispiele

Beispiel 1

5 Klonierung von Phytoene Synthase-Genen aus Tabak

Die Klonierung der 5'- und 3'-Termini der PSY erfolgte über RACE-PCR. Die erhaltenen Fragmente wurden sequenziert. Aus den Sequenzen der Fragmente wurde die vollständige Sequenz für die PSY zusammengesetzt. Von den sequenzierten

10 Fragmenten zeigte jeweils ein mittleres und ein 3'-terminales Fragment eine abweichende Sequenz mit einer Homologie von ungefähr 80 % auf Nukleotidebene gegenüber den sonstigen Fragmenten. Im überlappenden Bereich waren diese beiden Fragmente 100 % identisch. Die Tatsache der Übereinstimmung der zwei abweichenden Fragmente aus verschiedenen PCR-Reaktionen implizierte das Vorhanden-

15 sein eines weiteren PSY-Gens in Tabak. Die bereits vollständige PSY-Sequenz bekam daher den Zusatz PSY1, die abweichende Sequenz den Zusatz PSY2. Entsprechend der partiellen Sequenz der PSY2 wurde ein neuer Primer für die RACE-Amplifikation des entsprechenden 5'-Terminus definiert. Unter Verwendung dieses Primers wurden 5'-terminale Fragmente erhalten. Die Sequenzen dieser Fragmente

20 wurden bestimmt. Sie zeigten 100% Homologie im überlappenden Bereich zu der bereits vorliegenden Sequenz der PSY2. Aus den Sequenzen der Fragmente wurde die vollständige Sequenz der PSY2 zusammengesetzt. Auf Basis der erhaltenen Sequenzen wurden die Proteinsequenzen ermittelt. Das gefundene offene Leseraster für die PSY1 kodiert ein Protein von 439 Aminosäuren entsprechend ~48 kDa. Das

25 offene Leseraster für die PSY2 kodiert ein Protein von 410 Aminosäuren entsprechend ~45 kDa. Die beiden PSY-Gene aus Tabak zeigen auf Aminosäureebene eine Homologie von 86 %. Dabei liegen die größten Abweichungen in zwei Deletionen von 4 und 22 Aminosäuren im N-terminalen Bereich. Die PSY1 und PSY2 zeigen auf Aminosäureebene Homologien von 96 % respektive 93 % zur PSY2 aus Tomate

30 und von 85 % respektive 87 % zur PSY1 aus Tomate. Aus allen anderen Pflanzen ist jeweils höchstens ein PSY-Gen bekannt.

Die genaue Durchführung der Klonierung wird im Folgenden beschrieben.

5 Im Gewächshaus wurde Tabaksamen ausgelegt und nach 4 Wochen aus den Keimlingen gesamt-RNA präpariert. Die gRNA wurde als Vorlage für die Synthese doppelsträngiger cDNA eingesetzt. Die cDNA wurde mit Klenowfragment aufgefüllt und mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. An die cDNA wurden Marathon-Adaptoren (5'-ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc aggt-3' / 3'-cccg tcca-5') ligiert (Clontech, Advantage cDNA PCR Kit).

10

Ein Fragment der kodierenden Sequenz der Phytoene Synthase aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-tatgtaagacgttttatct tggaac-3' und 5'-ccatacaggc catctgctag c-3' amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde über TOPO TA-Cloning in den bakteriellen Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz des amplifizierten Fragments wurde durch Sequenzierung nach Sanger bestimmt. Zwei unterschiedliche Sequenzen wurden erhalten und mit PSY1 und PSY2 benannt.

15

Der 5'-Terminus der Sequenz der Phytoene Synthase 1 aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-ccatcgacta gctcatcgttctctctgcac c-3' und 5'-ccatcctaatacgaactcacta tagggc-3' amplifiziert.

20

Der 5'-Terminus der Sequenz der Phytoene Synthase 2 aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-aagccggtct tcccacatataggcttg g-3' und 5'-ccatcctaatacgaactcacta tagggc-3' amplifiziert.

25

Die 3'-Termini der Sequenz der Phytoene Synthase 1 und 2 aus *Nicotiana tabacum* wurden mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen gemäß 5'-agtaggactg atgagtgttc cagttatggg tattgcacc-3' und 5'-ccatcctaatacgaactcacta tagggc-3' amplifiziert.

30

Die amplifizierten Fragmente wurden über TOPO TA-Cloning in den bakteriellen Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzen der amplifizierten Fragmente wurden durch Sequenzierung nach Sanger bestimmt.

- 5 Die transkribierte Sequenz der Phytoene Synthase 1 aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-agaaaccag aaagaacaac aggtttg-3' und 5'-ctcacttgag gggttgatga gtgtgg-3' amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde über TOPO TA-Cloning in den bakteriellen Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz des amplifizierten Fragments wurde durch
10 Sequenzierung nach Sanger bestimmt. Die Sequenz wurde mit PSY1 benannt.

- Die kodierende Sequenz der Phytoene Synthase 1 aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen gemäß 5'-ttcccgggtt gtttcagtag catg-3' und 5'-ttcccgggtc attcatgtct ttgc-3' amplifiziert. Das amplifizierte
15 Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *Xma I* nachgeschnitten. Das entstandene *XmaI*-PSY1-Fragment wurde in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pSS ligiert. Die entstandenen Konstrukte pSS-PSY1 wurden durch Restriktionskartierung auf die Orientierung des Transgens überprüft.

- 20 Die kodierende Sequenz der Phytoene Synthase 2 aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-atgaattctg tcaaaatg ctgttgcc-3' und 5'-atgaattcct gatgtctatg ccttagctag ag-3' amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* nachgeschnitten. Das entstandene *EcoRI*-PSY2-Fragment wurde in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pSS ligiert. Die entstandenen Konstrukte pSS-PSY2 wurden durch
25 Restriktionskartierung auf die Orientierung des Transgens überprüft.

Beispiel 2**Klonierung der Zeta-Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum***

Im Gewächshaus wurde Tabaksamen ausgelegt und nach 4 Wochen aus den Keim-
lingen gesamt-RNA präpariert. Die gRNA wurde als Vorlage für die Synthese
doppelsträngiger cDNA eingesetzt. Die cDNA wurde mit Klenowfragment aufgefüllt
und mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. An die cDNA wurden Marathon-
Adaptoren (5'-ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc aggt-3' / 3'-cccg tcca-5')
ligiert (Clontech, Advantage cDNA PCR Kit).

Ein Fragment der kodierenden Sequenz der Zeta-Carotene Desaturase aus *Nicotiana
tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-
gagctggact tgcaggcatg tcg-3' und 5'-aactggaaga attcgcgcc gcaggaattt tttttttt tttt-3'
amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde über TOPO TA-Cloning in den
bakteriellen Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz des amplifizierten
Fragments wurde durch Sequenzierung nach Sanger bestimmt.

Der 5'-Terminus der Sequenz der Zeta-Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum*
wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-tccacctcat
gtccttgatc caagagctcc-3' und 5'-ccatcctaata acgactcacta tagggc-3' amplifiziert. Das
amplifizierte Fragment wurden über TOPO TA-Cloning in den bakteriellen Vektor
pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz des amplifizierten Fragments wurde durch
Sequenzierung nach Sanger bestimmt.

Die transkribierte Sequenz der Zeta-Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum*
wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen 5'-ctggcatctt
acatctgcca aatttc-3' und 5'-tcttctcaat gaatgatgag caatacgatc c-3' amplifiziert. Das
amplifizierte Fragment wurde über TOPO TA-Cloning in den bakteriellen Vektor
pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz des amplifizierten Fragments wurde durch
Sequenzierung nach Sanger bestimmt. Die Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 wurde er-
halten.

Die kodierende Sequenz der Zeta-Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen gemäß SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 4 amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *Xma I* nachgeschnitten. Das entstandene *XmaI*-ZDS-Fragment wurde in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pSS ligiert. Die entstandenen Konstrukte pSS-ZDS wurden durch Restriktionskartierung auf die Orientierung des Transgens überprüft.

Das gefundene offene Leseraster für die ZDS kodiert für ein Protein von 588 Aminosäuren entsprechend ~65 kDa. Die Homologie auf Aminosäureebene zu der bekannten ZDS aus *Capsicum annuum* liegt bei 95%. Es handelt sich demnach um die plastidäre ZDS aus Tabak.

Beispiel 3

Klonierung der Phytoene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* SR1

Im Gewächshaus wurde Tabaksamen ausgelegt und nach 4 Wochen aus den Keimlingen gesamt-RNA präpariert. Die gRNA wurde als Vorlage für die Synthese einzelsträngiger cDNA eingesetzt (Pharmacia, 1st strand cDNA Synthesis Kit).

Die kodierende Sequenz der Phytoene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* wurde mit Hilfe der PCR-Technik mit den Primern der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 10 amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *Xma I* nachgeschnitten. Das entstandene *XmaI*-PDS-Fragment wurde in den linearisierten und dephosphorylierten Vektor pSS ligiert. Die entstandenen Konstrukte pSS-PDS wurden durch Restriktionskartierung auf die Orientierung des Transgens überprüft.

Beispiel 4**Southern und Northern Blot**

5 Für die weitere Charakterisierung der PSY-Gene aus Tabak wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Genomische DNA aus Tabak wurde präpariert und mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die DNA wurde auf Nitrocellulose geblottet und mit radioaktiv markierter Sonde PSY1 hybridisiert. Es sind jeweils 3 bzw. 4

10 Banden zu erkennen. Um einen Hinweis auf die Funktionalität der zwei oder gegebenenfalls mehr PSY-Gene in Tabak zu erhalten, wurden Tabak-Samen im Gewächshaus ausgelegt. Nach 2, 4 und 6 Wochen wurde ein Teil des Pflanzenmaterials geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Parallel wurden Blütenblätter von adulten Tabakpflanzen geerntet und ebenso behandelt. Von diesem Material wurden mRNA-Präparationen durchgeführt. Die mRNA wurde auf Nitrocellulose übertragen

15 (Slot Blot) und getrennt mit radioaktiven PSY1- und PSY2-Sonden hybridisiert. Die beiden Gene zeigen insgesamt ein stark unterschiedliches Transkriptions-Niveau. Das Verhältnis der beiden Gene bleibt jedoch unabhängig vom Entwicklungsstadium konstant.

20 **Beispiel 5**

Ausschalten der für Enzyme des Carotinoid-Biosynthesewegs kodierenden Gene in Tabak

25 Mit den erhaltenen Sequenzen der PSY, PDS und ZDS sowie der bekannten Sequenz der LCY aus Tabak wurden Primer für die Amplifikation der vollständigen kodierenden Sequenzen definiert. Mit diesen Primern wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Amplifikate wurden mittels TOPO TA-Cloning (Invitrogen) in den bakteriellen Vektor pCR2.1 kloniert. Die Identität der Insertionen wurde durch Sequenzierung

30 überprüft. Für alle Gene wurden Primer für die Amplifikation mit beidseitiger *Xma* I-Restriktionsschnittstelle definiert. Mit diesen Primern wurden PCR-Reaktionen

durchgeführt. Als Template dienten die Konstrukte der Gene im Vektor pCR2.1. Die erhaltenen Fragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease *Xma* I geschnitten. Der binäre Vektor pSS wurde ebenfalls mit *Xma* I geschnitten und mit alkaliner Phosphatase aus Kalbsthymus dephosphoryliert. Die geschnittenen Gene wurden in den Vektor pSS ligiert. Die erhaltenen Konstrukte wurden mittels Restriktionsanalysen hinsichtlich der Orientierung der Gene in *sense* oder *antisense* überprüft. Mehrere Klone wurden ausgewählt und zusätzlich durch Sequenzierung der Übergänge von pSS und Gen überprüft.

Die ausgewählten Konstrukte sowie der leere Vektor pSS (Kontrolle) wurden in kompetente S17.1-Zellen transformiert. Durch Konjugation wurden die Plasmide auf *Agrobacterium tumefaciens* pMP90RK übertragen. Die Agrobakterien-Kulturen wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der Plasmide überprüft. Die Transformation von Tabakpflanzen mit den pSS-Konstrukten erfolgte über zwei unterschiedliche Ansätze. Ausgehend von 4 Wochen alten Sprosskulturen von *Nicotiana tabacum* SR1 wurden Protoplasten isoliert. Die Protoplasten wurden durch Cokultur mit den Agrobakterien transformiert. Dabei wurden die Agrobakterien mit den Konstrukten der Gene in *sense* und *antisense* für die Cokultur eingesetzt. Aus transformierten Protoplasten wurden unter entsprechendem Selektionsdruck Kalli gezogen. Je Konstrukt und Kontrolle wurden 70 Kalli regeneriert. Parallel wurden Blattscheiben-Transformationen mit allen Konstrukten durchgeführt.

Nach der Umsetzung auf kanamycinhaltigem Medium regenerierter Sprosse wurden die verbliebenen Kalli jedes einzelnen Konstrukts vereinigt. Von diesem Material wurde mRNA präpariert und als Slot-Blot auf Nitrocellulosemembran in 4 identischen Kopien übertragen. Je eine Kopie wurde mit je einer radioaktiven Sonde der PSY1, PDS, ZDS und LCY hybridisiert. In allen Proben zeigen sich starke Signale für die Transkripte der jeweils in die Pflanzen übertragenen Gene. Die Aktivität des doppelten 35S-Promoter ist damit nachgewiesen.

Die regenerierten Sprosse wurden in Sterilkultur bewurzelt. Die Spitze wurde auf neues Medium umgesetzt und der Spross heruntergeschnitten. Nach Bewurzelung der

Spitze wurde der neu getriebene Spross aus der Sterilkultur im Gewächshaus in Erde gepflanzt. Die bewurzelte Spitze blieb in Sterilkultur und wurde in regelmäßigen Zeitabständen auf frisches Medium umgesetzt.

- 5 Von den transgenen Gewächshauspflanzen wurde nach 5-6 Wochen ein Blatt in einer Höhe von etwa $\frac{2}{3}$ der Pflanze abgeschnitten. Von diesem Blatt wurden 0,5 g mit einer Spatelspitze Magnesiumoxid und 3 ml Aceton im Potter zerkleinert. Der Aufschluss wurde filtriert und über HPLC der Gehalt an Xanthophyllen, Carotinoiden und Chlorophyllen bestimmt. Das verbliebene Blattmaterial wurde sofort in flüssigem
- 10 Stickstoff eingefroren und gemörsert. Von diesem Material wurden mRNA-Präparationen für Slot-Blots durchgeführt.

Beispiel 6

15 Phänotypische Analyse der transgenen Pflanzen

- Die transgenen Pflanzen mit der Phytoene Synthase in *sense*-Orientierung zeigen sowohl in der Sterilkultur als auch im Gewächshaus phänotypisch zum Teil starke Effekte. Die Blattmorphologie ist stark beeinflusst: junge Blätter weisen zum Teil eine leicht orange-gelbe Färbung auf, die jedoch mit zunehmendem Alter verblasst,
- 20 ältere Blätter weisen dann eine sehr unregelmäßige blassgrüne Pigmentierung auf. Die Blätter sind zudem dickfleischig, behaart und sehr fest, ihre Ränder rollen sich von den Seiten nach innen. Die Pflanzen sind insgesamt in ihrer Entwicklung gegenüber Kontrollpflanzen stark retardiert. Die Blüten einiger besonders stark betroffener Pflanzen sind fast farblos und weisen nicht die den Kontrollpflanzen eigene rosa Färbung der Blütenblätter auf. Die Samenkapseln sind deutlich orange statt grün gefärbt.
- 25 Die Messung der Carotinoid-, Xanthophyll- und Chlorophyllgehalte dieser Pflanzen zeigt die Akkumulation geringer Mengen von Phytoen und einen deutlichen Anstieg des β -Carotin-Gehaltes. Phytoen als direktes Produkt der Phytoene Synthase lässt sich in Kontrollpflanzen unter den gegebenen Bedingungen nicht nachweisen. Des
- 30 weiteren zeigen die transgenen Pflanzen eine Reduktion im Chlorophyllgehalt von bis zu 40%. Dies lässt sich auf die Umleitung von Geranylgeranylpyrophosphat aus

der Phytolsynthese in die Carotinoidsynthese zurückführen, die dann in Folge zu einer reduzierten Chlorophyllsynthese führt.

5 Transgene Pflanzen mit der Phytoene Desaturase in *antisense*-Orientierung zeigen im Gewächshaus Effekte in der Blattpigmentierung. Die Blätter weisen weiße Adern auf, die Blattspitzen sind teilweise vollständig weiß. Die Samenkapseln einer Linie waren ebenfalls vollständig weiß. Die Messung der Carotinoidgehalte der betroffenen Linien zeigt eine sehr starke Akkumulation von Phytoen, die ungefähr in der Größenordnung liegt, die bei Norflurazon-behandelten Tabakpflanzen gefunden wird. Die Gehalte an Xanthophyllen und Chlorophyll sind reduziert. Von einer der betroffenen Linien wurden Samen einer geselbsteten Pflanze ausgelegt und unter Selektion zur Keimung gebracht. Diese Keimlinge zeigten eine Aufspaltung in 3 Phänotypen. Selektionierten Pflanzen, die nur weiße Cotyledonen aufwiesen, sowie grüne und weiße Pflanzen, die über die Primärblätter hinauswuchsen. Bei den weißen 10 Keimlingen handelt es sich um homozygot transgene Pflanzen. Nach Umsetzen in das Gewächshaus starben alle weißen Pflanzen innerhalb einer Woche, die grünen zeigen den beschriebenen Phänotyp der adulten heterozygoten Pflanzen. Die Bestimmung der Profile zeigte für die grünen Keimlinge eine sehr starke Akkumulation von Phytoen. Bei den weißen Keimlingen konnte kein β -Carotin und nur noch 15 geringe Mengen an Xanthophyllen nachgewiesen werden. 20

Literatur

- 5 Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.Z.; Miller W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST und PSI-BLAST generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402
- 10 Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. FEBS Letters (1997) 400, 271-274.
- Pecker, I., Chamovitz, D., Linden, H., Sandmann, G., Hirschberg, J. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to β -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. Plant Molecular Biology (1996) 30, 807-819.
- 15 Bonk, M., Hoffmann, B., Lintig, von, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H., Beyer, P. Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. Eur. J. Biochem. (1997) 247, 942-950.
- 20 Dogbo, O., Laferrière, A., d'Harlingue, A., Camara, B. Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. PNAS (1988) 85, 7054-7058.
- 25 Fire, A., Xu, S. Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature (1998) 391, 806-811.
- 30 Fray, R.G., Wallace, A., Fraser, P.D., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P.M., Grierson, D. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. Plant J. (1995) 8 (5), 693-701.

- 5 Lintig, von , J, Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A., Kleinig, H.
Light-dependant regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of
phytoene synthase exoression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* an
Arabidopsis thaliana seedlings. Plant J. (1997) 12(3), 625-634.
- Lottspeich, F., Zorbas H. (Hrsg.) 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag,
Heidelberg, Berlin.
- 10 Minet, M., Dufour, M.-E. and Lacroute, F. 1992. Complementation of *Saccharomy-*
ces cerevisiae auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. Plant J. 2: 417-
422.
- 15 Neudert, U., Martinez, I.M., Fraser, P.D., Sandmann, G. Espression of an active
phytoene synthase form *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the
enzyme. Biochimics et Biophysica Acta (1998) 1392, 51-58.
- 20 Norris, S.R., Barrette, T., DellaPenna, D. Genetic dissection of carotenoid synthesis
in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desatu-
ration. Plant Cell (1995) 7, 2139-2149.
- 25 Wetzl, C.M., Rodermel, S.R. Regulation of phytoene desaturase expression is
independant of leaf pigment content in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular
Biology (1998) 37, 1045-1053.
- 30 Corona, V., Aracri, B., Kosturkova, G., Bartley, G.E., Pitto, L., Giorgetti, L. Scolnik,
P.A., Giuliano, G. Regulation o a carotenoid biosynthesis gene promoter during
plant development. The Plant J. (1996) 9(4), 505-512.
- Trebst, A., Depka, B. Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photo-
system II in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters (1997) 400, 359-362.

Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D., Gantt, E.
Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a
mechanism for control of cyclic carotenoid formation. Plant Cell, 8: 1613-1626,
5 1996.

Erläuterungen zum Sequenzprotokoll und zu den Abbildungen

SEQ ID NO. 1

5 DNA-Sequenz kodierend für eine Phytoene Synthase aus *Nicotiana tabacum*. Die von der DNA kodierte Aminosäuresequenz ist angegeben.

SEQ ID NO. 2

10 Aminosäuresequenz eines Polypeptids mit der Aktivität einer Phytoene Synthase aus *Nicotiana tabacum*.

SEQ ID NO. 3

DNA-Sequenz kodierend für eine Phytoene Synthase aus *Nicotiana tabacum*. Die von der DNA kodierte Aminosäuresequenz ist angegeben.

15 **SEQ ID NO. 4**

Aminosäuresequenz eines Polypeptids mit der Aktivität einer Phytoene Synthase aus *Nicotiana tabacum*.

SEQ ID NO: 5

20 DNA-Sequenz kodierend für die Zeta Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum*. Die von der DNA kodierte Aminosäuresequenz ist angegeben.

SEQ ID NO: 6

25 Aminosäuresequenz eines Polypeptids mit der Aktivität einer Zeta Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum*.

SEQ ID NO: 7

Oligonukleotid zur Amplifikation der Zeta-Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* mittels PCR-Technik.

30

SEQ ID NO: 8

Oligonukleotid zur Amplifikation der Zeta-Carotene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* mittels PCR-Technik.

5 **SEQ ID NO: 9**

Oligonukleotid zur Amplifikation der Phytoene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* mittels PCR-Technik.

SEQ ID NO: 10

10 Oligonukleotid zur Amplifikation der Phytoene Desaturase aus *Nicotiana tabacum* mittels PCR-Technik.

Abbildung 1

15 Carotinoidbiosynthese in den Plastiden von Pflanzen; Abkürzungen: PSY: Phytoene Synthase; PDS: Phytoene Desaturase; ZDS: Zetacarotene Desaturase; LCY: Lycopene β -Cyclase.

Abbildung 2

20 Überprüfung der Transkriptakkumulation in transgenen Kalli: Nach Umsetzung regenerierter Sprosse wurden die verbliebenen Kalli einer Transformation vereinigt. Von diesen Kalli-Mischungen wurde mRNA präpariert. Je ~500 ng der mRNA wurde auf Nitrocellulosemembran entsprechend dargestelltem Probenschema geblottet. Je eine der Membranen wurde mit einer radioaktiven Sonde der vier
25 verschiedenen Gene hybridisiert. Als Kontrollen wurde mRNA von 4 Wochen alten Tabak-Keimlingen und von 4 Wochen alten Reis-Keimlingen verwendet. Abkürzungen: Pp: Protoplasten, K3 0,4M: K3 0,4M-Medium, KPS:KPS-Medium.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuren, die für Polypeptide aus Tabak mit der biologischen Aktivität einer Zeta Carotene Desaturase, welche die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6 umfasst, kodieren.
5
2. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie für Polypeptide mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6 kodieren.
- 10 3. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA handelt.
4. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder cDNA handelt.
15
5. Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Tabakpflanzen stammen.
- 20 6. Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend eine Sequenz ausgewählt aus
 - (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 5
 - (b) Sequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6 umfasst,
25
 - (c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) oder (b) definierten Sequenzen,
 - 30 (d) Sequenzen, welche an die unter (a), (b) oder (c) definierten Sequenzen hybridisieren,

- (e) Sequenzen, welche zu den unter (a), (b) oder c) definierten Sequenzen komplementär sind, und
- 5 (f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter a) bis c) definierten Sequenzen.
- 10 7. Regulatorische Region, welche natürlicherweise die Transkription einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 in Pflanzenzellen, insbesondere in Tabakpflanzen, kontrolliert.
8. DNA-Konstrukt umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und einen heterologen Promotor.
- 15 9. Vektor umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, eine regulatorische Region gemäß Anspruch 7 oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 8.
- 20 10. Vektor gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
- 25 11. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 8 oder einen Vektor gemäß Anspruch 9 oder 10.
12. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine prokaryotische Zelle, insbesondere um *E. coli*, handelt.

13. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine eukaryotische Zelle, insbesondere um eine Hefe-, Insekten-, Säugetier oder Pflanzenzelle, handelt.
- 5 14. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Phytoene Synthase, welches von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 kodiert wird, umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:4.
- 10 15. Polypeptid mit der biologischen Aktivität eine Zeta Carotene Desaturase, welches von einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wird.
- 15 16. Antikörper, welcher spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 14 bindet.
17. Antikörper, welcher spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 15 bindet.
18. Verfahren zum Herstellen einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend die folgenden Schritte:
- 20 (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise oder
- (b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer genomischen oder cDNA-Bank, die ausgehend von genomischer DNA bzw. mRNA aus Pflanzenzellen hergestellt wurde, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen oder
- 25 (c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.
- 30

19. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids gemäß Anspruch 14 oder 15, umfassend
- 5 (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 gewährleisten, oder
- 10 (b) das Exprimieren einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 in einem *in vitro*-System, und
- (c) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem *in vitro*-System.
- 15 20. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die an ein Polypeptid gemäß Anspruch 14 und/oder 15 oder ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Phytoene Desaturase bindet, umfassend die folgenden Schritte:
- 20 (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, eines Polypeptids gemäß Anspruch 14 oder 15 oder eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität einer Phytoene Desaturase mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und
- 25 (b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.
- 30 21. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, welche die Expression von Polypeptiden gemäß Anspruch 14, 15 oder eines Polypeptids mit der biolo-

gischen Aktivität einer Phytoene Desaturase verändert, umfassend die folgenden Schritte:

- 5 (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,
- (b) Bestimmen der Polypeptidkonzentration, und
- 10 (c) Bestimmen der Verbindung, welche die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.
22. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, eines DNA-Konstrukts gemäß Anspruch 8, eines Vektors gemäß Anspruch 9 oder 15 10, einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, eines Polypeptids gemäß Anspruch 14 oder 15 oder eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität einer Phytoene Desaturase oder eines Antikörpers gemäß Anspruch 16 oder 17 zum Auffinden neuer herbizider Wirkstoffe.
- 20 23. Verwendung eines Modulators eines Polypeptids gemäß Anspruch 14 oder 15 oder eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität einer Phytoene Desaturase als Pflanzenwuchsregulator oder Herbizid.
24. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, eines DNA-Konstrukts gemäß Anspruch 8 oder eines Vektors gemäß Anspruch 9 25 oder 10 zum Herstellen von transgenen Pflanzen.
25. Transgene Pflanzen, Pflanzenteile, Protoplasten, Pflanzengewebe oder Pflanzenvermehrungsmaterialien, dadurch gekennzeichnet, dass nach Einbringen einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, eines DNA-Konstrukts gemäß Anspruch 8 oder eines Vektors gemäß Anspruch 9 die intra- 30

zelluläre Konzentration eines Polypeptids gemäß Anspruch 16 oder 17 im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen erhöht oder vermindert ist.

- 5 26. Pflanzen, Pflanzenteile, Protoplasten, Pflanzengewebe oder Pflanzenvermehrungsmaterialien, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Polypeptid gemäß Anspruch 14 oder 15 enthalten, dessen biologische Aktivität oder Expressionsmuster im Vergleich zu den entsprechenden endogenen Polypeptiden verändert ist.
- 10 27. Verfahren zum Herstellen von Pflanzen, Pflanzenteilen, Protoplasten, Pflanzengeweben oder Pflanzenvermehrungsmaterialien gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder eine regulatorische Region gemäß Anspruch 7 durch endogene Mutagenese verändert.

Verfahren zum Auffinden von Modulatoren von Enzymen des Carotenoid-Biosyntheseweges

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für die die Zeta Carotene Synthase aus Tabak kodieren, davon kodierte Polypeptide sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren der Aktivität der Zeta Carotene Synthase, der Phytoene Synthase und der Phytoene Desaturase.

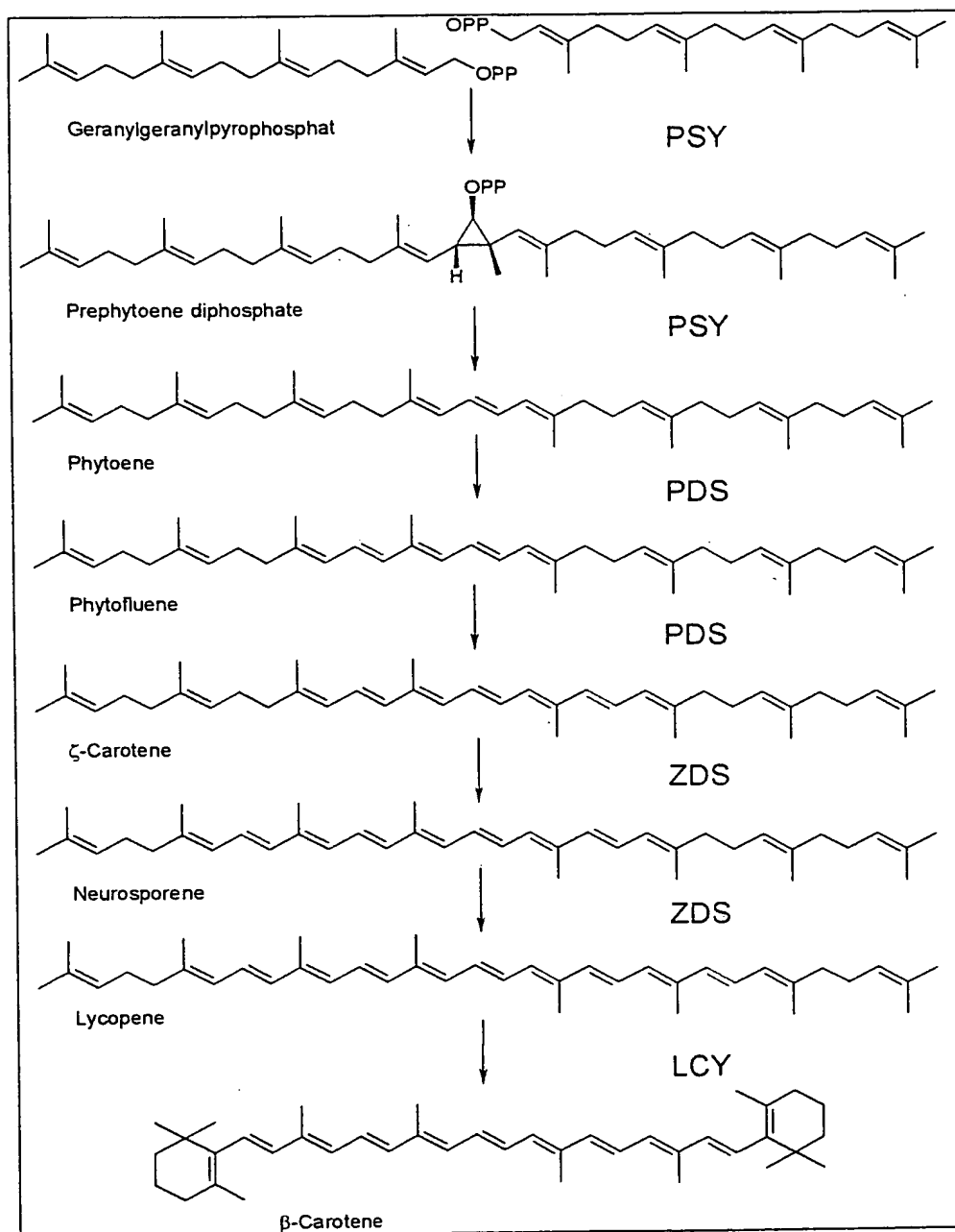
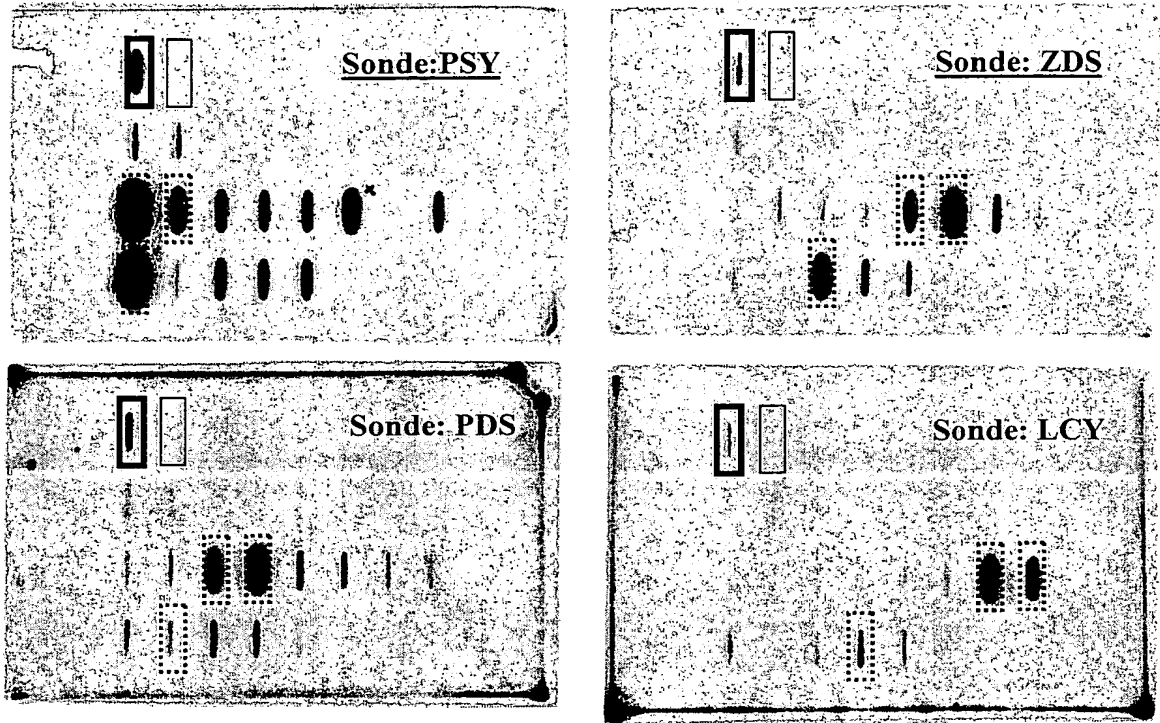




Abbildung 1



Probenschema der 4 identischen Blots:

SRI	<i>O. sativa</i>						
Kontrolle (+KO)	Kontrolle (-KO)						
Pp	Pp	Pp	Pp	Pp	Pp		
K304M	K304M	K304M	KPS	KPS	KPS		
t=0h	t=2h	t=4h	t=0h	t=2h	t=4h		
Pool PSY antisense	Pool PSY sense	Pool PDS antisense	Pool PDS sense	Pool ZDS antisense	Pool ZDS sense	Pool LCY antisense	Pool LCY sense
Pool PSY	Pool PDS	Pool ZDS	Pool LCY	Pool pSS			
antis/sens	antis/sens	antis/sens	antis/sens				

 : Kontrolle *N. tabacum* SR1, 4 Wochen alte Keimlinge

 : Kontrolle *O. sativa*, 4 Wochen alte Keimlinge


 : bei Transkription des Transgens durch 35S-Promoter erwartetes starkes Signal

Abbildung 2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BAYER AG

5

<120> DNA kodierend für die Phytoene Synthase aus Tabak

<130> Le A 34 326

10

<140>

<141>

<160> 10

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1728

<212> DNA

20

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (244) .. (1566)

25

<400> 1

agaaaccag aaagaacaac aggttttgct tcttggtgat gaggcattt gcctctgctt 60

gtgtaaggca aagtcggttc actttcttat atccgatttt tataatcggt gaaattagtg
120

5 gatagactct agtggatata tacaagtatt ggttttttga taaaataggc tgaggtgaga
180

aggtaacata aaggaaagac aaaaacttgg gaattgtttt agaccaccga ggtttcttgt
240

10 ttc atg agc atg tct gtt gct ttg ttg tgg gtt gtt tct ccc act tcc
288

Met Ser Met Ser Val Ala Leu Leu Trp Val Val Ser Pro Thr Ser

1 5 10 15

15 gag gtc tcg aat ggg aca gga ttg ttg gat tca gtc cga gaa gga aac
336

Glu Val Ser Asn Gly Thr Gly Leu Leu Asp Ser Val Arg Glu Gly Asn

20 25 30

20 cgc gtc ttt gta tca tcc agg ttc cta gct cga gat agg aat ttg atg
384

Arg Val Phe Val Ser Ser Arg Phe Leu Ala Arg Asp Arg Asn Leu Met

35 40 45

25 tgg aat ggg aga atc aag aaa ggt ggg aga caa agg tgg aat ttt ggc
432

Trp Asn Gly Arg Ile Lys Lys Gly Gly Arg Gln Arg Trp Asn Phe Gly

50 55 60

30 tct tta att gct gat cca aga tat tca tgc ttg ggt gga tca aga act
480

Ser Leu Ile Ala Asp Pro Arg Tyr Ser Cys Leu Gly Gly Ser Arg Thr

65 70 75

gaa aag gga agc act ttc tct gta cag tcc agt ttg gtg gct agc cca
 528
 Glu Lys Gly Ser Thr Phe Ser Val Gln Ser Ser Leu Val Ala Ser Pro
 5 80 85 90 95

gct gga gaa atg act gtg tca tca gag aaa aag gtg tat gat gtg gta
 576
 Ala Gly Glu Met Thr Val Ser Ser Glu Lys Lys Val Tyr Asp Val Val
 10 100 105 110

tta aag cag gca gct tta gtg aag agg cag ctg aga tct acc gat gat
 624
 Leu Lys Gln Ala Ala Leu Val Lys Arg Gln Leu Arg Ser Thr Asp Asp
 15 115 120 125

tta gaa gtg aag ccg gat att gtt gtt cca ggg aat ttg ggc ttg ttg
 672
 Leu Glu Val Lys Pro Asp Ile Val Val Pro Gly Asn Leu Gly Leu Leu
 20 130 135 140

agt gaa gca tat gat cgt tgt ggc gaa gta tgt gca gag tat gca aag
 720
 Ser Glu Ala Tyr Asp Arg Cys Gly Glu Val Cys Ala Glu Tyr Ala Lys
 25 145 150 155

aca ttt tac tta gga acc aag cta atg acc cca gag aga aga aga gct
 768
 Thr Phe Tyr Leu Gly Thr Lys Leu Met Thr Pro Glu Arg Arg Arg Ala
 30 160 165 170 175

atc tgg gca ata tat gtg tgg tgc agg aga acg gat gag ctt gtt gat
816

Ile Trp Ala Ile Tyr Val Trp Cys Arg Arg Thr Asp Glu Leu Val Asp

180

185

190

5

ggc cct aat gca tcc cac ata act ccg caa gct tta gat agg tgg gag
864

Gly Pro Asn Ala Ser His Ile Thr Pro Gln Ala Leu Asp Arg Trp Glu

195

200

205

10

acc agg ctg gaa gat att ttc agt ggg cgg cca ttt gat atg ctt gat
912

Thr Arg Leu Glu Asp Ile Phe Ser Gly Arg Pro Phe Asp Met Leu Asp

210

215

220

15

gct gct tta tcc gat act gtc tcc aga ttt cct gtt gat att cag cca
960

Ala Ala Leu Ser Asp Thr Val Ser Arg Phe Pro Val Asp Ile Gln Pro

225

230

235

20

ttc aga gat atg att gaa gga atg cgt atg gac ttg tgg aaa tcc aga
1008

Phe Arg Asp Met Ile Glu Gly Met Arg Met Asp Leu Trp Lys Ser Arg

240

245

250

255

25

tac aaa act ttc gat gag cta tat ctc tat tgt tac tat gtt gct ggt
1056

Tyr Lys Thr Phe Asp Glu Leu Tyr Leu Tyr Cys Tyr Tyr Val Ala Gly

260

265

270

30

act gta gga ttg atg agt gtt cca gtt atg ggt att gca cct gaa tca
1104

Thr Val Gly Leu Met Ser Val Pro Val Met Gly Ile Ala Pro Glu Ser

275

280

285

5

aag gca aca aca gag agt gta tat aat gct gct ttg gct tta ggg ctt
1152

Lys Ala Thr Thr Glu Ser Val Tyr Asn Ala Ala Leu Ala Leu Gly Leu

290

295

300

10

gca aat caa cta acc aat ata ctc aga gat gta gga gaa gat gcc aga
1200

Ala Asn Gln Leu Thr Asn Ile Leu Arg Asp Val Gly Glu Asp Ala Arg

305

310

315

15

aga gga aga gta tac ttg cct caa gat gaa tta gca cag gca ggg ctc
1248

Arg Gly Arg Val Tyr Leu Pro Gln Asp Glu Leu Ala Gln Ala Gly Leu

320

325

330

335

20

tcc gac gaa gac ata ttt gct gga aga gtg act gat aag tgg agg aac
1296

Ser Asp Glu Asp Ile Phe Ala Gly Arg Val Thr Asp Lys Trp Arg Asn

340

345

350

25

ttt atg aag aaa caa att cag agg gcg agg aaa ttc ttt gat gag tca
1344

Phe Met Lys Lys Gln Ile Gln Arg Ala Arg Lys Phe Phe Asp Glu Ser

355

360

365

30

gag aaa ggt gtc aca gaa ctg gac tct gct agt aga tgg cct gtg tta
1392

Glu Lys Gly Val Thr Glu Leu Asp Ser Ala Ser Arg Trp Pro Val Leu

370

375

380

aca gcg ctg ctg ttg tat cgc aag ata ttg gac gag att gaa gcc aac
1440

Thr Ala Leu Leu Leu Tyr Arg Lys Ile Leu Asp Glu Ile Glu Ala Asn

5

385

390

395

gac tac aac aac ttc aca agg agg gct tat gtt agc aag cca aag aag
1488

Asp Tyr Asn Asn Phe Thr Arg Arg Ala Tyr Val Ser Lys Pro Lys Lys

10

400

405

410

415

ctt ctc acc ttg ccc att gct tat gca aaa tct ctt gtg ccc cct aat
1536

Leu Leu Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Ala Lys Ser Leu Val Pro Pro Asn

15

420

425

430

aga act tcc tct cca cta gca aag aca tga atgaagtagt tgagtcaatg
1586

Arg Thr Ser Ser Pro Leu Ala Lys Thr

20

435

440

agtattatac actaaagaaa ctcaggtact tgtaaagtag atatcttttg ctaaagtgtg
1646

25

atcatcaaaa gtagattgta aattcaatat gacaatctct tggtagaata ttttctccac
1706

actcatcaaaa
1728

ccctcaagtg

ag

30

<210> 2

<211> 440

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

5 <400> 2

Met Ser Met Ser Val Ala Leu Leu Trp Val Val Ser Pro Thr Ser Glu

1 5 10 15

Val Ser Asn Gly Thr Gly Leu Leu Asp Ser Val Arg Glu Gly Asn Arg

10 20 25 30

Val Phe Val Ser Ser Arg Phe Leu Ala Arg Asp Arg Asn Leu Met Trp

35 40 45

15 Asn Gly Arg Ile Lys Lys Gly Gly Arg Gln Arg Trp Asn Phe Gly Ser

50 55 60

Leu Ile Ala Asp Pro Arg Tyr Ser Cys Leu Gly Gly Ser Arg Thr Glu

65 70 75 80

20

Lys Gly Ser Thr Phe Ser Val Gln Ser Ser Leu Val Ala Ser Pro Ala

85 90 95

Gly Glu Met Thr Val Ser Ser Glu Lys Lys Val Tyr Asp Val Val Leu

25 100 105 110

Lys Gln Ala Ala Leu Val Lys Arg Gln Leu Arg Ser Thr Asp Asp Leu

115 120 125

30 Glu Val Lys Pro Asp Ile Val Val Pro Gly Asn Leu Gly Leu Leu Ser

	130		135		140
	Glu Ala Tyr Asp Arg Cys Gly Glu Val Cys Ala Glu Tyr Ala Lys Thr				
	145		150		155 160
5					
	Phe Tyr Leu Gly Thr Lys Leu Met Thr Pro Glu Arg Arg Arg Ala Ile				
		165		170	175
	Trp Ala Ile Tyr Val Trp Cys Arg Arg Thr Asp Glu Leu Val Asp Gly				
10		180		185	190
	Pro Asn Ala Ser His Ile Thr Pro Gln Ala Leu Asp Arg Trp Glu Thr				
		195		200	205
15	Arg Leu Glu Asp Ile Phe Ser Gly Arg Pro Phe Asp Met Leu Asp Ala				
	210		215		220
	Ala Leu Ser Asp Thr Val Ser Arg Phe Pro Val Asp Ile Gln Pro Phe				
	225		230		235 240
20					
	Arg Asp Met Ile Glu Gly Met Arg Met Asp Leu Trp Lys Ser Arg Tyr				
		245		250	255
	Lys Thr Phe Asp Glu Leu Tyr Leu Tyr Cys Tyr Tyr Val Ala Gly Thr				
25		260		265	270
	Val Gly Leu Met Ser Val Pro Val Met Gly Ile Ala Pro Glu Ser Lys				
		275		280	285
30	Ala Thr Thr Glu Ser Val Tyr Asn Ala Ala Leu Ala Leu Gly Leu Ala				

290 295 300

Asn Gln Leu Thr Asn Ile Leu Arg Asp Val Gly Glu Asp Ala Arg Arg
305 310 315 320

5 Gly Arg Val Tyr Leu Pro Gln Asp Glu Leu Ala Gln Ala Gly Leu Ser
325 330 335

Asp Glu Asp Ile Phe Ala Gly Arg Val Thr Asp Lys Trp Arg Asn Phe
10 340 345 350

Met Lys Lys Gln Ile Gln Arg Ala Arg Lys Phe Phe Asp Glu Ser Glu
355 360 365

15 Lys Gly Val Thr Glu Leu Asp Ser Ala Ser Arg Trp Pro Val Leu Thr
370 375 380

Ala Leu Leu Leu Tyr Arg Lys Ile Leu Asp Glu Ile Glu Ala Asn Asp
385 390 395 400

20 Tyr Asn Asn Phe Thr Arg Arg Ala Tyr Val Ser Lys Pro Lys Lys Leu
405 410 415

Leu Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Ala Lys Ser Leu Val Pro Pro Asn Arg
25 420 425 430

Thr Ser Ser Pro Leu Ala Lys Thr
435 440

<210> 3

<211> 1712

<212> DNA

5 <213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (333) .. (1565)

10

<400> 3

cttgaagagt agcagcagca agcaagahaa ttaaagtggg ctatttbkka naagccattg 60

15

ttacmagara attaagaagc caagamacag gttattttct acttgagtya ggaaaagttg
120

gtttgcttta tttgtgggct ttttataatc ttttttccac aagggaaggt gggtattttc
180

20

ttgaaagtgg atttagactc tagtggggaat ctactaggag taaatttatt aattttttat
240

aaattaagca gaggaaggaa ggaaacagaa aacagaaagt aagacaaaaa accttggaat
300

25

tgtttttagaa agccaagggtt ttctgttca aa atg tct gtt gcc ttg tta tgg
353

Met Ser Val Ala Leu Leu Trp

1

5

30

gtt gtt tca cct tgt gaa gtc tca aat ggg aca gga ttc ttg gat tca
401

Val Val Ser Pro Cys Glu Val Ser Asn Gly Thr Gly Phe Leu Asp Ser

10

15

20

5

gtc cgg gag gga aac cgg gtt ttt gat tcg tcg agg cat agg aat tta
449

Val Arg Glu Gly Asn Arg Val Phe Asp Ser Ser Arg His Arg Asn Leu

25

30

35

10

gtg tgc aat gag aga aac aag aga ggt gtg aaa caa agg tgg aat ttt
497

Val Cys Asn Glu Arg Asn Lys Arg Gly Val Lys Gln Arg Trp Asn Phe

40

45

50

55

15

ggg tct gta agg tct gct atg gtg gct aca ccg gcg gga gaa atg gcg
545

Gly Ser Val Arg Ser Ala Met Val Ala Thr Pro Ala Gly Glu Met Ala

60

65

70

20

acg atg aca tca gaa cag atg gtt tat gat gtg gtt tta aaa caa gca
593

Thr Met Thr Ser Glu Gln Met Val Tyr Asp Val Val Leu Lys Gln Ala

75

80

85

25

gct tta gtg aag agg cag ttg aga tct gct gat gat tta gaa gtg aag
641

Ala Leu Val Lys Arg Gln Leu Arg Ser Ala Asp Asp Leu Glu Val Lys

90

95

100

30

ccg gag atc cct ctc ccc ggg aat ttg agc ttg ttg agt gaa gca tat
689

Pro Glu Ile Pro Leu Pro Gly Asn Leu Ser Leu Leu Ser Glu Ala Tyr

105

110

115

gat agg tgt agt gaa gta tgt gca gag tat gca aag aca ttt tac tth
 737
 Asp Arg Cys Ser Glu Val Cys Ala Glu Tyr Ala Lys Thr Phe Tyr Xaa
 5 120 125 130 135

 gga acc atg yta atg act cca gag aga aga agg gct att tgg gca ata
 785
 Gly Thr Met Xaa Met Thr Pro Glu Arg Arg Arg Ala Ile Trp Ala Ile
 10 140 145 150

 tat gtg tgg tgc agg aga aca gat gaa ctt gtt gat ggc cca aac gca
 833
 Tyr Val Trp Cys Arg Arg Thr Asp Glu Leu Val Asp Gly Pro Asn Ala
 15 155 160 165

 tca cat att aca ccc caa gcc tta gat agg tgg gaa gac cgg ctt gaa
 881
 Ser His Ile Thr Pro Gln Ala Leu Asp Arg Trp Glu Asp Arg Leu Glu
 20 170 175 180

 gat gtt ttc agc ggg cga cca ttt gat atg ctc gat gct gct ttg tcc
 929
 Asp Val Phe Ser Gly Arg Pro Phe Asp Met Leu Asp Ala Ala Leu Ser
 25 185 190 195

 gat act gtt tcc aag ttt cca gtt gat att cag ccg ttc aga gat atg
 977
 Asp Thr Val Ser Lys Phe Pro Val Asp Ile Gln Pro Phe Arg Asp Met
 30 200 205 210 215

- 13 -

att gaa gga atg cgt atg gac ttg agg aag tca aga tat aga aac ttt
1025

Ile Glu Gly Met Arg Met Asp Leu Arg Lys Ser Arg Tyr Arg Asn Phe

220

225

230

5

gat gag ctt tac ctc tat tgt tat tac gtt gct ggt acg gtt ggg ttg
1073

Asp Glu Leu Tyr Leu Tyr Cys Tyr Tyr Val Ala Gly Thr Val Gly Leu

235

240

245

10

atg agt gtt cca att atg ggt att gca cct gat tca aag gca aca aca
1121

Met Ser Val Pro Ile Met Gly Ile Ala Pro Asp Ser Lys Ala Thr Thr

250

255

260

15

gag agc gta tat aat gca gct ttg gct tta gga atc gca aat caa cta
1169

Glu Ser Val Tyr Asn Ala Ala Leu Ala Leu Gly Ile Ala Asn Gln Leu

265

270

275

20

acg aac ata ctc aga gat gtt gga gaa gat gcc aga aga gga aga gtc
1217

Thr Asn Ile Leu Arg Asp Val Gly Glu Asp Ala Arg Arg Gly Arg Val

280

285

290

295

25

tac tta cct caa gat gaa tta gca cag gca ggt ctc ttc gac gat gac
1265

Tyr Leu Pro Gln Asp Glu Leu Ala Gln Ala Gly Leu Phe Asp Asp Asp

300

305

310

30

ata ttt gct gga aaa gtg act gat aag tgg aga agc ttt atg aag aag
1313

- 14 -

Ile Phe Ala Gly Lys Val Thr Asp Lys Trp Arg Ser Phe Met Lys Lys

315

320

325

5

caa atc cag agg gca aga aag ttc ttc gat gag gca gag gaa gga gtt
1361

Gln Ile Gln Arg Ala Arg Lys Phe Phe Asp Glu Ala Glu Glu Gly Val

330

335

340

10

aca caa ctg agc tca gct agc aga tgg cct gta tgg gca tct ttg ctg
1409

Thr Gln Leu Ser Ser Ala Ser Arg Trp Pro Val Trp Ala Ser Leu Leu

345

350

355

15

ttg tac cgc caa ata ctg gac gag att gaa gcc aat gac tac aac aac
1457

Leu Tyr Arg Gln Ile Leu Asp Glu Ile Glu Ala Asn Asp Tyr Asn Asn

360

365

370

375

20

ttc aca aag aga gct tat gtg agc aaa cca aag aag cta att tcc tta
1505

Phe Thr Lys Arg Ala Tyr Val Ser Lys Pro Lys Lys Leu Ile Ser Leu

380

385

390

25

cct att gct tat gca aaa tct ctt gtg ccc cct aca aga act ctt gtc
1553

Pro Ile Ala Tyr Ala Lys Ser Leu Val Pro Pro Thr Arg Thr Leu Val

395

400

405

30

acc tct agc taa ggcatagaca tcagatttaa attaaagcaa gaaagcatat
1605

Thr Ser Ser

410

actgttaaaa aagaaagaat ttctaaagta gatattgttg tattgatgcc acttgatat
1665

5 catcaaaagt aggtagtaaa atccaatata acaatctcta gtagttg
1712

<210> 4

10 <211> 410

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 4

15 Met Ser Val Ala Leu Leu Trp Val Val Ser Pro Cys Glu Val Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Gly Phe Leu Asp Ser Val Arg Glu Gly Asn Arg Val Phe Asp
20 25 30

20 Ser Ser Arg His Arg Asn Leu Val Cys Asn Glu Arg Asn Lys Arg Gly
35 40 45

Val Lys Gln Arg Trp Asn Phe Gly Ser Val Arg Ser Ala Met Val Ala
25 50 55 60

Thr Pro Ala Gly Glu Met Ala Thr Met Thr Ser Glu Gln Met Val Tyr
65 70 75 80

30 Asp Val Val Leu Lys Gln Ala Ala Leu Val Lys Arg Gln Leu Arg Ser
85 90 95

- 16 -

	Ala	Asp	Asp	Leu	Glu	Val	Lys	Pro	Glu	Ile	Pro	Leu	Pro	Gly	Asn	Leu	
				100					105					110			
5	Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asp	Arg	Cys	Ser	Glu	Val	Cys	Ala	Glu	
				115					120					125			
	Tyr	Ala	Lys	Thr	Phe	Tyr	Xaa	Gly	Thr	Met	Xaa	Met	Thr	Pro	Glu	Arg	
				130					135					140			
10	Arg	Arg	Ala	Ile	Trp	Ala	Ile	Tyr	Val	Trp	Cys	Arg	Arg	Thr	Asp	Glu	
				145					150					155		160	
	Leu	Val	Asp	Gly	Pro	Asn	Ala	Ser	His	Ile	Thr	Pro	Gln	Ala	Leu	Asp	
15									165					170		175	
	Arg	Trp	Glu	Asp	Arg	Leu	Glu	Asp	Val	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Phe	Asp	
									180					185		190	
20	Met	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Ser	Asp	Thr	Val	Ser	Lys	Phe	Pro	Val	Asp	
									195					200		205	
	Ile	Gln	Pro	Phe	Arg	Asp	Met	Ile	Glu	Gly	Met	Arg	Met	Asp	Leu	Arg	
									210					215		220	
25	Lys	Ser	Arg	Tyr	Arg	Asn	Phe	Asp	Glu	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Cys	Tyr	Tyr	
									225					230		235	240
	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Leu	Met	Ser	Val	Pro	Ile	Met	Gly	Ile	Ala	
30														245		250	255

Pro Asp Ser Lys Ala Thr Thr Glu Ser Val Tyr Asn Ala Ala Leu Ala
260 265 270

5 Leu Gly Ile Ala Asn Gln Leu Thr Asn Ile Leu Arg Asp Val Gly Glu
275 280 285

Asp Ala Arg Arg Gly Arg Val Tyr Leu Pro Gln Asp Glu Leu Ala Gln
290 295 300

10 Ala Gly Leu Phe Asp Asp Asp Ile Phe Ala Gly Lys Val Thr Asp Lys
305 310 315 320

Trp Arg Ser Phe Met Lys Lys Gln Ile Gln Arg Ala Arg Lys Phe Phe
15 325 330 335

Asp Glu Ala Glu Glu Gly Val Thr Gln Leu Ser Ser Ala Ser Arg Trp
340 345 350

20 Pro Val Trp Ala Ser Leu Leu Leu Tyr Arg Gln Ile Leu Asp Glu Ile
355 360 365

Glu Ala Asn Asp Tyr Asn Asn Phe Thr Lys Arg Ala Tyr Val Ser Lys
370 375 380

25 Pro Lys Lys Leu Ile Ser Leu Pro Ile Ala Tyr Ala Lys Ser Leu Val
385 390 395 400

Pro Pro Thr Arg Thr Leu Val Thr Ser Ser
30 405 410

```

5      <210> 5
      <211> 2205
      <212> DNA
      <213> Nicotiana tabacum

10     <220>
      <221> CDS
      <222> (189)..(1955)

      <400> 5
      ctggcatctt acatctgcca aattttctcat ttatagcatc tcctaattctt tagatacctt 60

15     ttctttcttgt tttgtttttc tatccttcac ttcattgcttt cttgtttttac ccatctcttc
      120

      cattttcttg gcatttgaca acaaaagggtt ccattttttt tccttttttgc tgtatatagc
20     180

      acaattca atg gct act tct tca gct tat ctt tgt tgt cct gca act tct
      230

      Met Ala Thr Ser Ser Ala Tyr Leu Cys Cys Pro Ala Thr Ser
25     1 5 10

      gct act gga aag aaa cat att ttg cca aat ggg tca gct gga ttc ttg
      278

      Ala Thr Gly Lys Lys His Ile Leu Pro Asn Gly Ser Ala Gly Phe Leu
30     15 20 25 30

```

gtt ttc cgt ggt ccc cgt ttg tcc aac cgg ttt gtg acc cgg aag tca
326

Val Phe Arg Gly Pro Arg Leu Ser Asn Arg Phe Val Thr Arg Lys Ser

35

40

45

5

gtt att cgt gct gat ttg gac tcc atg gtc tct gat atg agt act aat
374 ,

Val Ile Arg Ala Asp Leu Asp Ser Met Val Ser Asp Met Ser Thr Asn

50

55

60

10

gct cca aaa ggg cta ttt cca cct gaa cct gaa cat tat cgg ggg cca
422

Ala Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro

65

70

75

15

aag ctg aaa gta gct att att gga gct ggg ctt gca ggc atg tca act
470

Lys Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr

80

85

90

20

gct gtg gag ctc ttg gat caa gga cat gag gtg gat ata tat gaa tca
518

Ala Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser

95

100

105

110

25

agg cct ttt att ggt ggg aaa gtg gga tct ttt gtt gat aga cgt gga
566

Arg Pro Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Arg Arg Gly

115

120

125

30

aac cac att gaa atg gga ctg cat gtg ttc ttt ggt tgc tat aat aat
614

Asn His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn

130

135

140

5

ttg ttc cgt ttg tta aaa aag gtg ggt gct gaa aaa aat ctg cta gtg
662

Leu Phe Arg Leu Leu Lys Lys Val Gly Ala Glu Lys Asn Leu Leu Val

145

150

155

10

aag gac cat act cac aca ttt gta aat aaa ggg ggt gaa ata ggg gag
710

Lys Asp His Thr His Thr Phe Val Asn Lys Gly Gly Glu Ile Gly Glu

160

165

170

15

ctt gat ttc cgc ttt cca gtt gga gca ccc cta cac gga att aat gca
758

Leu Asp Phe Arg Phe Pro Val Gly Ala Pro Leu His Gly Ile Asn Ala

175

180

185

190

20

ttt ttg tct acc aat cag cta aag att tat gat aag gct aga aat gct
806

Phe Leu Ser Thr Asn Gln Leu Lys Ile Tyr Asp Lys Ala Arg Asn Ala

195

200

205

25

gta gct ctt gcc ctt agt cca gtg gtg cgg gct tta gtt gat cca gat
854

Val Ala Leu Ala Leu Ser Pro Val Val Arg Ala Leu Val Asp Pro Asp

210

215

220

30

ggc gcg ttg cag cag ata cgt gat cta gat agt gta agc ttt tca gag
902

Gly Ala Leu Gln Gln Ile Arg Asp Leu Asp Ser Val Ser Phe Ser Glu

225

230

235

	tgg ttt atg tct aaa ggt ggg acg cgt gct agc atc cag agg atg tgg
	950
	Trp Phe Met Ser Lys Gly Gly Thr Arg Ala Ser Ile Gln Arg Met Trp
5	240 245 250
	gat cct gtc gca tat gct ctt gga ttc att gac tgt gac aat atc agt
	998
	Asp Pro Val Ala Tyr Ala Leu Gly Phe Ile Asp Cys Asp Asn Ile Ser
10	255 260 265 270
	gct cgg tgt atg ctc act ata ttt gca tta ttt gcc act aaa acg gag
	1046
	Ala Arg Cys Met Leu Thr Ile Phe Ala Leu Phe Ala Thr Lys Thr Glu
15	275 280 285
	gct tcc cta tta cgc atg ctt aaa ggt tct ccg gac gtt tat ttg agt
	1094
	Ala Ser Leu Leu Arg Met Leu Lys Gly Ser Pro Asp Val Tyr Leu Ser
20	290 295 300
	ggt cca att aag aag tac atc ttg gat aag ggg gga agg ttt cac atg
	1142
	Gly Pro Ile Lys Lys Tyr Ile Leu Asp Lys Gly Gly Arg Phe His Met
25	305 310 315
	agg tgg ggg tgc aga cag gta ctc tat gag aca tcc tct gat ggc agt
	1190
	Arg Trp Gly Cys Arg Gln Val Leu Tyr Glu Thr Ser Ser Asp Gly Ser
30	320 325 330

atg tat gtc agc ggg ctt gcc atg tca aag gcc act cag aag aaa gtt
1238

Met Tyr Val Ser Gly Leu Ala Met Ser Lys Ala Thr Gln Lys Lys Val

335 340 345 350

5

gta aaa gct gat gcc tat gtc gct gca tgt gat gtc cct gga att aaa
1286

Val Lys Ala Asp Ala Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys

355 360 365

10

cga ttg gta cct cag aag tgg agg gaa ttg gaa ttc ttt gac aac att
1334

Arg Leu Val Pro Gln Lys Trp Arg Glu Leu Glu Phe Phe Asp Asn Ile

370 375 380

15

tac aaa ttg gtt gga gtg cct gtt gtt acg gta caa cta cga tac aat
1382

Tyr Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn

385 390 395

20

ggc tgg gtt aca gag ttg cag gac ttg gag cgt tcg agg caa ttg aag
1430

Gly Trp Val Thr Glu Leu Gln Asp Leu Glu Arg Ser Arg Gln Leu Lys

400 405 410

25

cgc gct aca ggt ttg gac aat ctc ctg tat aca cca gat gca gat ttc
1478

Arg Ala Thr Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe

415 420 425 430

30

tct tgc ttt gcg gac ctt gca ttg gca tct cct gaa gat tat tac att
1526

Ser Cys Phe Ala Asp Leu Ala Leu Ala Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile

435

440

445

5

gag ggc caa ggc tca ttg ctt caa tgt gtc ctt aca cct ggt gac cct
1574

Glu Gly Gln Gly Ser Leu Leu Gln Cys Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro

450

455

460

10

tac atg cct cta cta aat gat gaa atc ata aaa aga gtg tca aag cag
1622

Tyr Met Pro Leu Leu Asn Asp Glu Ile Ile Lys Arg Val Ser Lys Gln

465

470

475

15

gtt ttg gca cta ttt cct tct tcc caa ggt ctt gag gtt acc tgg tca
1670

Val Leu Ala Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Thr Trp Ser

480

485

490

20

tca gtt gtg aaa att ggg caa tcc cta tat cgt gaa gga cct ggt aaa
1718

Ser Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys

495

500

505

510

25

gac cca ttc aga cct gat cag aag act cca gtg gaa aat ttc ttt ctt
1766

Asp Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Glu Asn Phe Phe Leu

515

520

525

30

gct ggc tca tat aca aaa cag gac tac ata gat agc atg gaa ggg gca
1814

Ala Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala

530

535

540

act ctt tca ggt agg caa gca tct gca tac gta tgt gat gct ggc gag
1862

Thr Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ser Ala Tyr Val Cys Asp Ala Gly Glu
5 545 550 555

aag ctg gtg gtg ttg cgg aaa aag att gct gct gct gag tca aac gag
1910

Lys Leu Val Val Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Ala Glu Ser Asn Glu
10 560 565 570

atc tct gaa ggt gta tca gta tct gat gag ttg agt ctt gtc tga
1955

Ile Ser Glu Gly Val Ser Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val
15 575 580 585

tgactggaaa tcatccaatg aatactgaag agcaccctccc actttgttaa tccgagaagc
2015

agatacaaac ataactcagt taggcattgc gtaaggaaga gttcttctaa attttgagtt
20 2075

cacaagatgg aaatcaaaaag gttaaaatat gttgtatgta atattagtaa atcttcatag
2135

25

tgatgtatct attctgccac ccttcagggt tagtgaaatg gatcgtattg ctcattcatc
2195

attgagaaga
30 2205

<210> 6

<211> 588

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

5 <400> 6

Met Ala Thr Ser Ser Ala Tyr Leu Cys Cys Pro Ala Thr Ser Ala Thr

1 5 10 15

Gly Lys Lys His Ile Leu Pro Asn Gly Ser Ala Gly Phe Leu Val Phe

10 20 25 30

Arg Gly Pro Arg Leu Ser Asn Arg Phe Val Thr Arg Lys Ser Val Ile

35 40 45

15 Arg Ala Asp Leu Asp Ser Met Val Ser Asp Met Ser Thr Asn Ala Pro

50 55 60

Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys Leu

65 70 75 80

20

Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala Val

85 90 95

Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg Pro

25 100 105 110

Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Arg Arg Gly Asn His

115 120 125

30 Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu Phe

	130		135		140											
	Arg	Leu	Leu	Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Glu	Lys	Asn	Leu	Leu	Val	Lys	Asp
	145					150					155					160
5																
	His	Thr	His	Thr	Phe	Val	Asn	Lys	Gly	Gly	Glu	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp
						165					170				175	
	Phe	Arg	Phe	Pro	Val	Gly	Ala	Pro	Leu	His	Gly	Ile	Asn	Ala	Phe	Leu
10						180					185				190	
	Ser	Thr	Asn	Gln	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asp	Lys	Ala	Arg	Asn	Ala	Val	Ala
						195									205	
15	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Val	Arg	Ala	Leu	Val	Asp	Pro	Asp	Gly	Ala
		210						215						220		
	Leu	Gln	Gln	Ile	Arg	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Ser	Phe	Ser	Glu	Trp	Phe
	225					230					235				240	
20																
	Met	Ser	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	Ala	Ser	Ile	Gln	Arg	Met	Trp	Asp	Pro
						245					250				255	
	Val	Ala	Tyr	Ala	Leu	Gly	Phe	Ile	Asp	Cys	Asp	Asn	Ile	Ser	Ala	Arg
25					260				265					270		
	Cys	Met	Leu	Thr	Ile	Phe	Ala	Leu	Phe	Ala	Thr	Lys	Thr	Glu	Ala	Ser
					275				280					285		
30	Leu	Leu	Arg	Met	Leu	Lys	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Gly	Pro

290

295

300

Ile Lys Lys Tyr Ile Leu Asp Lys Gly Gly Arg Phe His Met Arg Trp

305

310

315

320

5

Gly Cys Arg Gln Val Leu Tyr Glu Thr Ser Ser Asp Gly Ser Met Tyr

325

330

335

Val Ser Gly Leu Ala Met Ser Lys Ala Thr Gln Lys Lys Val Val Lys

340

345

350

10

Ala Asp Ala Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg Leu

355

360

365

15

Val Pro Gln Lys Trp Arg Glu Leu Glu Phe Phe Asp Asn Ile Tyr Lys

370

375

380

Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly Trp

385

390

395

400

20

Val Thr Glu Leu Gln Asp Leu Glu Arg Ser Arg Gln Leu Lys Arg Ala

405

410

415

Thr Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser Cys

25

420

425

430

Phe Ala Asp Leu Ala Leu Ala Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu Gly

435

440

445

30

Gln Gly Ser Leu Leu Gln Cys Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr Met

- 28 -

450

455

460

Pro Leu Leu Asn Asp Glu Ile Ile Lys Arg Val Ser Lys Gln Val Leu

465

470

475

480

5

Ala Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Thr Trp Ser Ser Val

485

490

495

Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp Pro

-10

500

505

510

Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Glu Asn Phe Phe Leu Ala Gly

515

520

525

15

Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr Leu

530

535

540

Ser Gly Arg Gln Ala Ser Ala Tyr Val Cys Asp Ala Gly Glu Lys Leu

545

550

555

560

20

Val Val Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Ala Glu Ser Asn Glu Ile Ser

565

570

575

Glu Gly Val Ser Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val

25

580

585

<210> 7

30

<211> 24

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 7

5 aacccgggat agcacgattc aatg

24

<210> 8

<211> 25

10 <212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 8

15 aacccgggat ttccagtcac cagac

25

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

20 <213> Nicotiana tabacum

<400> 9

ttcccgggct cagtaaaatg cc

22

25

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

30

<400> 10

tacccgggct aaactacgct tgc

23